



(51) 国際特許分類6 C12N 5/08, C12M 3/00	A1	(11) 国際公開番号 WO98/32840
		(43) 国際公開日 1998年7月30日(30.07.98)

(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00244
(22) 国際出願日 1998年1月22日(22.01.98)
(30) 優先権データ
特願平9/24517 1997年1月24日(24.01.97) JP
特願平9/54300 1997年2月24日(24.02.97) JP
特願平9/143002 1997年5月19日(19.05.97) JP

(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類
国際調査報告書

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)
旭メディカル株式会社(ASAHI MEDICAL CO., LTD.)(JP/JP)
〒100 東京都千代田区内幸町1丁目1番1号 Tokyo, (JP)

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ)

澄田政哉(SUMITA, Masaya)(JP/JP)
〒870-03 大分県大分市大字里2344-5 Oita, (JP)

寺嶋修司(TERASHIMA, Shuji)(JP/JP)

〒870-03 大分県大分市大字久原460-703 Oita, (JP)

(74) 代理人

弁理士 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.)

〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号

新大手町ビル331 Tokyo, (JP)

(54)Title: METHOD FOR SEPARATING CELLS

(54)発明の名称 細胞分離方法

(57) Abstract

A method for separating cells which involves the steps of introducing a cell-containing liquid containing the cells to be collected together with the cells to be eliminated into cell-capture means capable of substantially capturing the cells to be collected while passing the cells to be eliminated therethrough; discarding the liquid containing the cells to be eliminated from the means; and introducing a liquid having a viscosity of from 5 mPa.s to 500 mPa.s into the cell-capture means to thereby recover the cells to be collected, which have been captured in the cell-capture means, therefrom.

回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、該回収必要細胞を実質的に捕捉し該除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除去対象細胞含有液を該細胞捕捉手段から導出させ、次に該細胞捕捉手段に5 mPa・s以上500 mPa・s以下の粘度を有する液体を導入して該細胞捕捉手段に捕捉されている該回収必要細胞を該細胞捕捉手段から回収する工程を含む細胞分離方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FR	フランス	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SD	スーダン
AT	オーストリア	DE	ドイツ	MC	モナコ	DG	ジブチ
AZ	アゼルバイジャン	BE	ベルギー	MD	モルドバ	JM	ジャマイカ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	EG	エジプト	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BB	バハマ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BF	ブルkinaファソ	GU	グアム	ML	マリ	UA	ウクライナ
BG	ブルガリア	HN	ホンジュラス	MN	モンゴル	AG	アンティグア・バーブーダ
BJ	ベナン	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	GS	ジブラルタル
BR	ブラジル	IL	イスラエル	MW	マラウイ	GU	グアム
BY	ベラルーシ	IT	イタリア	MX	メキシコ	UU	ウニタ
CA	カナダ	JP	日本	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CC	ココス (キリング) 諸島	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CD	コンゴ民主共和国	KR	韓国	NZ	ニュージーランド		
CF	中央アフリカ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
CG	コンゴ共和国	KG	キルギス	RO	ルーマニア		
CH	スイス	LA	ラオス	RS	セルビア		
CN	中国	LR	ラトヴィア	SE	スウェーデン		
CO	コロンビア			SI	スロベニア		
CR	コスタリカ			SK	スロバキア		
CZ	チェコ			SL	シエラレオネ		
DD	ドイツ						
DE	ドイツ						
EE	エストニア						
ES	スペイン						

明 細 書

細胞分離方法

5 技術分野

本発明は各種の細胞の混合溶液から必要な細胞のみを分離、回収する方法に関する。得られた細胞は造血幹細胞移植療法等、細胞を用いて行う各種疾病の治療及び免疫学や細胞生物学等の基礎科学分野で用いることが可能となる。

背景技術

- 10 白血球（顆粒球、単球、リンパ球）と赤血球とを含んだ血液等の体液からフィルターに白血球を捕捉し、リンパ球を回収する技術に関しては、特開昭54-119012号公報等が知られている。

- ところで、造血幹細胞移植において、臍帯血幹細胞は、ドナー侵襲をひきおこさない造血幹細胞のソースとして注目を集めており、欧米諸国を中心に盛んにその臨床応用が試みられている。臍帯血幹細胞は、他の造血幹細胞移植、すなわち
15 骨髓移植又は末梢血幹細胞移植のようにドナーから採取されてすぐ患者に移植されることはまれであるので、採取時から使用時まで保存しておくことが必要である。特に非血縁者間移植の場合などは、そのような保存を必要とすることが多い。臍帯血は凍結保存に際し、解凍後に破壊される赤血球による副作用を防止し、凍
20 結保存時の体積を小さくする目的で、有核細胞を分離し、赤血球を除去すべきであるとされており、現在はほとんどの場合に分離保存が行われている（南江堂、「末梢血幹細胞移植」、第173ページ）。特公平8-69号公報には、臍帯血をフィコールハイパキュー法（比重液による遠心分離法であり、以下これをフィコール法と略す）で分離するためのプロトコルの詳細が開示されている。しか
25 しながら、フィコール法は実験室レベルの、非常に煩雑で長時間を要する操作であるという問題がある。また、WO96/17514公報には、ヒドロキシエチルスターチを用いて臍帯血中の赤血球を凝集沈降分離し、有核細胞濃厚液を得るためのバッグシステム、方法及びその方法により得られた細胞液が開示されている。本法は煩雑な操作を少なくするという点では従来のフィコール法と比べ若干

の改善となっているが、遠心分離が2回必要であるため、やはり長時間の作業を要することになる。

一方、フィコール法や赤血球凝集除去に代わる造血幹細胞分離方法も散見されるようになった。特開平8-104643号公報には、赤血球を通過させるフィルターに造血幹細胞を捕捉させた後、最初の通液方向とは逆方向の液流を惹起させて造血幹細胞を回収する方法が開示されている。しかしながら回収のための液体としてはHBSS（ハンス液）が用いられているにすぎなかった。

デキストランはモノマーとしてのグルコースを、主として $\alpha-1, 6$ 結合によって結合させた多糖類であり、古くから白血球分離剤として用いられてきた。しかしながら、デキストランによる白血球の分離は、試験管内の赤血球を凝集沈降させ、必要に応じ遠心分離し、上清の白血球をピペットで回収するというデキストランの赤血球凝集剤としての作用を利用するものである（三輪史朗編集、臨床検査技術全書、第3巻、「血液検査」、第425ページ）。しかし、ヒドロキシエチルデンプン等も同様の赤血球凝集作用があり、このような作用はデキストラン固有の性質ではない。

次に、造血幹細胞分離システムについて述べる。特開平7-184991号公報には臍帯血採取用器具が開示されており、特に、血液採取用容器の前に、臍帯血中の異物であるマイクロアグリゲートなどの凝集塊、組織片、骨片、脂肪塊等を除去するためのフィルターが開示されている。しかしながら、このフィルターは異物の除去が目的であり、回収を必要とする細胞の捕捉を目的としたものではない。また、仮に、該フィルターに造血幹細胞を捕捉することができる材料が偶然用いられたとしても、上記特開平第7-184991号公報には捕捉された造血幹細胞を回収するという記載は全くない。また、特開平8-52206号公報には、採取した臍帯血から造血幹細胞を分離することを目的とした臍帯血採取装置として膜型の血漿分離器を含む装置が開示されている。同公報には別の分離法として密度勾配分離、即ち、フィコール法による分離のための装置を用いる方法も開示されている。

本発明は、簡便な操作かつ短時間の操作で、回収を必要とする細胞（以下、回収必要細胞又は必要細胞と略す）と不要な細胞（以下、除去対象細胞と略す）と

- の混合物から必要細胞を高率で回収する方法、さらに詳しくは、細胞混合溶液から必要細胞をいったんフィルター等の細胞捕捉手段に捕捉させ、その捕捉された細胞を高率で回収する細胞分離方法、並びにその方法を実際に臨床現場で使用するために具現化した回路システム及びそれに用いる回収液、さらにそれらにより
- 5 得られる細胞含有液を提供することを目的とする。

- 本発明者らは従来の技術が有する問題点を解決すべく、細胞捕捉手段から細胞を回収する回収液の性状に着目して鋭意検討を重ねた結果、一定の粘度を有する回収液を用いて細胞回収操作を行うと、高い回収率が得られることを見出し、また、様々な回収液の組成について鋭意検討を重ねた結果、デキストランを含む生
- 10 理的溶液で細胞の回収を行うと、きわめて高い回収率が得られるという驚くべき効果を見出し、本発明を完成させたものである。

発明の開示

- すなわち、本発明は、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段
- 15 に導入し、除去対象細胞含有液を細胞捕捉手段から導出させ、次に細胞捕捉手段に $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する液体を導入して細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を細胞捕捉手段から回収する工程を含む細胞分離方法である。

- また本発明は、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入
- 20 し、除去対象細胞含有液を細胞捕捉手段から導出させ、次に細胞捕捉手段に $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する液体を導入して細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を細胞捕捉手段より回収し、その後回収した細胞を保存する工程を含む細胞分離保存方法である。

- 25 また本発明は、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除去対象細胞含有液を細胞捕捉手段から導出させ、次に細胞捕捉手段に $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する液体を導入して細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を細胞捕捉手段から回収し、次いで回収した細胞

を凍結保存し、その後凍結保存した細胞を解凍する工程を含む細胞分離保存方法である。

- また本発明は、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる、少なくとも入口と出口とを有する細胞捕捉手段と、細胞捕捉手段の入口より上流に接続される、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を細胞捕捉手段に注入する回路と、細胞捕捉手段の出口より下流に接続される細胞捕捉手段に液体を注入する回路と、細胞捕捉手段の入口より上流に接続される細胞捕捉手段の入口側から細胞を回収する回路とからなる細胞分離システムである。

- また本発明は、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を通過させる細胞捕捉手段に細胞捕捉手段の入口より上流に接続される回路を通じて回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を導入し、細胞捕捉手段の出口から除去対象細胞含有液を導出させ、次いで前記細胞捕捉手段の出口より下流に接続される回路から $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する液体を細胞捕捉手段に導入し、細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を細胞捕捉手段の入口より上流に接続される回路から回収する工程を含む細胞分離方法である。

また本発明は、実質的に赤血球および／または血小板を含まない $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する造血幹細胞含有液である。

- また本発明は、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除去対象細胞含有液を細胞捕捉手段から導出させ、次に細胞捕捉手段に $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する液体を導入して細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を細胞捕捉手段から回収する工程を含む細胞分離方法によって得られた実質的に除去対象細胞を含まない回収必要細胞含有液である。

- また本発明は、 $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する液体である、細胞捕捉手段から捕捉された細胞を回収するための回収用液体である。

図面の簡単な説明

図 1 は本発明による細胞分離システムの 1 実施態様である。

図 2 は実施例 1 で用いた細胞分離システムの模式図である。

図3は実施例4で用いた細胞分離システムの模式図である。

発明を実施するための最良の形態

- 本発明で言う回収必要細胞とは分離回収して何らかの用途に用いる細胞を言い、除去対象細胞とは先述の用途には不要であるか、または何らかの病因細胞である
- 5 等の理由で、回収必要細胞に混入することが問題となるため積極的に除去することが必要である細胞のことを言う。

- これらを含む細胞含有液としては、末梢血、骨髓、臍帯血（臍帯血管から採取されたものだけでなく、胎盤血管から採取されたものも含む）、リンパ液及びこれらに遠心分離等何らかの処理を施したもの、あるいは各種臓器や組織から抽出
- 10 した細胞を何らかの液体に再浮遊させたものが挙げられる。

- 有核細胞とは細胞内に核を有する細胞のことを言い、たとえば白血球、顆粒球、好中球、好塩基球、好酸球、骨髓球、赤芽球、リンパ球、Tリンパ球、ヘルパーTリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、サプレッサーTリンパ球、Bリンパ球、NK細胞、NK T細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、破骨細胞、骨芽細胞、
- 15 骨細胞、造血幹細胞、繊維芽細胞、軟骨芽細胞等が挙げられる。

- 造血幹細胞含有単核球分画とは、造血幹細胞および／または造血前駆細胞（以下、これらをまとめて単に造血幹細胞と略す）を含有する単核球集団のことである。単核球とは細胞内に核が1個存在する細胞の総称であり、具体的にはリンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞）、単球、造血幹細胞、骨髓球、芽球等が挙げら
- 20 れる。この単核球集団の造血幹細胞含有率は通常、0.01%～99%であり、原料細胞集団の種類、細胞処理の有無によりその含有率は異なる。造血幹細胞含有率は、たとえば、正常人末梢血中では通常0.01%前後であり、臍帯血では0.05～1.0%であり、骨髓では0.5～2%である。また、G-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）を投与された末梢血では造血幹細胞含有率は個人差
- 25 が著しく、0.1%から数%である。モノクローナル抗体による細胞分離、とくにフローサイトメトリー法による分離を行った場合、造血幹細胞含有率は99%にも達する場合がある。いずれにせよ、造血幹細胞含有単核球分画という語は造血幹細胞の含有率を何ら具体的に規定するものではない。

本発明で言う核を持たない細胞としては、たとえば赤血球、血小板が挙げられ

る。

- 本発明で言う「除去対象細胞が回収必要細胞とは異なる表面マーカーを有する」とは、たとえば回収必要細胞がヘルパーTリンパ球（表面マーカーとして抗CD4抗原を有する）で、除去対象細胞がサプレッサーTリンパ球（表面マーカーとして抗CD8抗原を有する）のように有核細胞という点では同一だが、表面マーカーが異なる（回収必要細胞と除去対象細胞は異なる亜集団に属する）ことを言う。

回収必要細胞が有核細胞であり、除去対象細胞が核を持たない細胞である場合の組み合わせとその用途の例を以下に示すが、これらに限定されるものではない。

- 10 1. 回収必要細胞：白血球、除去対象細胞：赤血球、用途：インターフェロン製造

2. 回収必要細胞：リンパ球、除去対象細胞：赤血球及び血小板、用途：養子免疫療法

- 15 3. 回収必要細胞：造血幹細胞含有単核球分画、除去対象細胞：赤血球及び血小板、用途：造血幹細胞移植

また、回収必要細胞が有核細胞であり、除去対象細胞が回収必要細胞とは異なる表面マーカーを有する有核細胞である場合の組み合わせとその用途の例を以下に示すが、これらに限定されるものではない。

- 20 1. 回収必要細胞：CD34陽性有核細胞、除去対象細胞：CD34陰性有核細胞、用途：CD34陽性細胞移植

2. 回収必要細胞：CD8陽性Tリンパ球、除去対象細胞：CD8陰性Tリンパ球、用途：養子免疫療法

- 25 また、回収必要細胞が有核細胞であり、除去対象細胞が核を持たない細胞及び回収必要細胞とは異なる表面マーカーを有する有核細胞である場合の組み合わせとその用途の例を以下に示すが、これらに限定されるものではない。

1. 回収必要細胞：CD34陽性有核細胞、除去対象細胞：赤血球、血小板、CD34陰性有核細胞、用途：CD34陽性細胞移植

2. 回収必要細胞：CD8陽性Tリンパ球、除去対象細胞：赤血球、血小板、CD8陰性Tリンパ球、用途：養子免疫療法

本発明における、少なくとも回収必要細胞は捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段としては、例えば、回収必要細胞を捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる材料を充填した液体流入口と液体流出口とを有する容器、あるいは容器内面に細胞捕捉面が存在する成形容器が挙げられる。回収必要細胞

5 を捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる材料は、回収必要細胞を選択的に捕捉できる限り通常用いられている細胞捕捉材であればいかなる材料も使用できるが、成型性、滅菌性や細胞毒性が低いという点で好ましいものを例示すると、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン等の合成高

10 分子、アガロース、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸塩等の天然高分子、ヒドロキシアパタイト、ガラス、アルミナ、チタニア等の無機材料、ステンレス、チタン、アルミニウム等の金属が挙げられる。

また、これらの捕捉材はそのままでも使用することができるが、細胞の選択的通過または捕捉を行う等の必要に応じて表面改質を施したものでよい。例えば、

15 血小板通過性を高めるにはWO 87/05812 公報で提案されている非イオン性親水基と塩基性含窒素官能基とを有するポリマーのコートによる方法等が挙げられる。細胞の選択的捕捉を行う場合、その方法として、アミノ酸、ペプチド、糖類、糖タンパク（抗体、接着分子等のバイオリガンドを含む）といった特定の細胞に親和性のあるリガンドを、例えば特開平2-261833号公報で提案さ

20 れているハロアセトアミド法により固定する方法等が挙げられる。

また、捕捉材の形状としては、粒状、繊維塊、織布、不織布、スポンジ状構造体、平板等が挙げられるが、体積あたりの表面積が大きいという点で粒状、繊維塊、織布、不織布、スポンジ状構造体が好ましく、取り扱い性の点から、繊維塊、織布、不織布、スポンジ状構造体といった多孔質構造体がさらに好ましく、なか

25 でも不織布、スポンジ状構造体が細胞液の流れ性、製造性の点から最も好ましい。

不織布を用いる場合、抗CD34モノクローナル抗体等の特定の細胞に特異的に結合するいわゆるバイオリガンド類を表面に固定しないときは、通常、繊維径は $1.0\mu\text{m}$ 以上 $30\mu\text{m}$ 以下であり、好ましくは $1.0\mu\text{m}$ 以上 $20\mu\text{m}$ 以下であり、さらにより好ましくは $1.5\mu\text{m}$ 以上 $10\mu\text{m}$ 以下である。 $1.0\mu\text{m}$ 未

満では回収必要細胞が強固に捕捉されてしまい回収困難となる可能性があり、好ましくない。30 μm を超えると、回収必要細胞が繊維に捕捉されず素通りする可能性が高くなる。いずれの場合でも回収率の低下につながるおそれがあるので好ましくない。

- 5 また、スポンジ状構造体を用いる場合、孔径は通常2.0 μm 以上25 μm 以下であり、好ましくは3.0 μm 以上20 μm 以下であり、さらにより好ましくは4.0 μm 以上15 μm 以下である。2.0 μm 以下では流れ性が著しく劣り、通液自体が困難になるおそれがあり、また25 μm を超えると回収必要細胞の捕捉率が低下し、回収率の低下を招くので好ましくない。
- 10 回収必要細胞を捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる材料を充填する容器の材質としては、成型性や滅菌性に優れ、細胞毒性が低いという点で好ましいものを例示すると、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン、塩化ビニル等の合成高分子、ヒドロキシアパタイト、ガラス、アルミナ、チタニア等の無機材料、ステンレス、チタン、アルミニウム等の金属が挙げ
- 15 られるが、これらに限定されるものではない。

また、細胞捕捉材を充填した容器以外の細胞捕捉手段の例である、容器内面に細胞捕捉面が存在する成形容器としては、例えばフラスコ、ディッシュ、コニカルチューブ、シリンジ、血液バッグが挙げられる。

- 20 本発明で言う「回収必要細胞は実質的に捕捉する」とは細胞含有液中の回収必要細胞の60%以上を捕捉することを言い、また「除去対象細胞を実質的に通過させる」とは細胞含有液中の除去対象細胞の60%以上を通過させることを言う。

本発明においては細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を特定粘度の液体（以下、回収液または回収用液体とも言う）で回収するが、この液体の粘度は

25 5 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上500 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以下であることが必要であり、好ましくは5 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上100 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以下、より好ましくは7 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上50 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以下である。粘度が5 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 未満では回収率が低く、500 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ を超えると、たとえポンプを用いたとしても、通液が著しく困難となり、作業性が劣る。また、圧力の上昇が起こり、回路内のチューブ接続部がリークする

可能性もあり好ましくない。なお、粘度の測定方法としては回転粘度計を用いる方法が最も簡便、かつ精度もよく好ましい。

- 回収液としては、細胞への悪影響が少ないものであればいずれの液体も使用でき、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等の合成高分子溶液、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシエチルデンプン、デキストラン、キチン誘導体、コラーゲン、フィブロネクチン、アルブミン、グロブリン等の天然高分子溶液、グルコース、サッカロース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、グリセリン、ジメチルスルホキシド、シリコンオイル等の有機物溶液及びこれらの混合物が挙げられる。本発明者らの検討で
- 10 は、デキストランの使用により特に優れた回収率が得られているので、以下デキストランについて詳細に説明する。

- 本発明で言うデキストランとは、グルコースのポリマーで、グルコースの大部分が $\alpha-1, 6$ 結合で結合しているものを言い、その部分加水分解物や硫酸エステル等の誘導体も包含される。分子量は制限がないが、溶解性や入手しやすさ等を考慮し、好ましい平均分子量は1000～1000万であり、より好ましくは
- 15 5000～500万、さらに好ましくは1万～100万である。分子量により同一濃度でも粘度が異なるので、粘度が5 mPa・s以上500 mPa・s以下になるように分子量または濃度を適宜調整する。医薬品として認可済みの、滅菌済みデキストラン40注（平均分子量約4万のデキストランの10 w/v %生理食
- 20 塩水溶液）が市販されているのでこれを好適に用いることができる。また、5 mPa・s以上500 mPa・s以下の粘度にするためにはデキストランのみを用いてもよく、または他の物質を混在させてもよい。その物質をいくつか例示すると、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等の合成高分子、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシエチルデンプン、デ
- 25 キストラン、キチン誘導体、コラーゲン、フィブロネクチン、アルブミン、グロブリン等の天然高分子、グルコース、サッカロース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、グリセリン、ジメチルスルホキシド等の有機物が挙げられる。デキストランの使用で、細胞の高率回収が如何なるメカニズムにより達成できるかは現時点では不明であるが、本発明者らはデキストランが細胞の捕捉材への接着

性を減弱させる性質を持っているのではないかと想定している。

- 5 mPa・s以上500mPa・s以下の粘度を有する液体を調製する際に溶質を溶かす溶媒としては、生理食塩水、D-PBS（ダルベッコリン酸塩緩衝液）、HBSS（ハンクス液）等の緩衝液、RPMI1640などの培地が挙げられる。また、これらの液体には栄養補給、細胞膜保護、抗凝固作用付与等の必要に応じ、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、アルブミン、グロブリン、グルコース、サッカロース、トレハロース、グロブリン、CPD（citrate-phosphate-dextrose）、ACD（acid-citrate-dextrose）、EDTA、ヘパリン等を添
- 10 加しても良い。

- また、本発明による特定の粘度を有する液体はこのまま回収必要細胞の凍結保存または液状保存に用い得るものであることがより好ましい。すなわち、前述したように造血幹細胞移植、特に臍帯血を用いる造血幹細胞移植では、フィコール法等により赤血球が除去された細胞集団を洗浄後（フィコール液は毒性があるため）、これに凍害保護剤等を添加して細胞浮遊液を調製し、これを液体窒素中または冷凍庫内で実際に使用されるまで凍結保存することが行われる。本発明においては、特定の粘度を有する回収用液体として、保存に使用し得るもの、特に凍結保存に使用し得るものを用いることにより、細胞分離後に煩雑な操作を加えることなく、保存用の細胞浮遊液を調製することができる。凍結保存に使用し得る
- 15 回収用液体とは、具体的には凍害保護剤、栄養成分、細胞膜保護成分等としても用いられるものが挙げられる。凍害保護剤はその作用機序により、1）細胞外凍害保護剤と2）細胞内凍害保護剤とに分類される。1）としてはヒドロキシエチルデンプン、デキストラン、ポリビニルピロリドン等の水溶性ポリマーが一般に用いられており、2）としてはジメチルスルホキシド、グリセリン等の低分子有機化合物が通常、用いられている。また、栄養成分としてはグルコースなどの糖
- 20 類、各種細胞培養用培地が挙げられる。また、細胞膜保護成分としては一般にアルブミンが用いられている。さらに、栄養成分と細胞膜保護成分とを合わせたものとして血漿が用いられることもある。先述したように、本発明の特定粘度を有する回収用液体はこれらの成分を単独または組み合わせて用いることがより好ま
- 25

しい。また、細胞回収後、例えば凍結保存時に上記成分を追加してもよい。

凍結方法としては、一般に -80°C のディープフリーザーを用いる簡便法あるいはプログラムフリーザーにより徐冷し、液体窒素中に保存する方法の2種類が用いられている。また、凍結保存した細胞を解凍する方法としては、 37°C での

5 温浴での急速解凍が一般的に行われている。

- 本発明で言う細胞含有液を細胞捕捉手段に導入する方法としては、該手段にチューブを介して細胞含有液を入れたバッグまたはボトルを接続して落差、ローラーポンプ、バッグを押しつぶし液流を惹起させること、などにより導入するか、細胞含有液を入れたシリンジを接続し、手で押すかシリンジポンプなどの装置を用いて送液すればよい。手で押す場合は簡便という特徴があり、装置を用いる場合、回収液導入の流速の制御が容易という特徴があるので、目的に応じそれぞれ適宜方法を選択すれば良い。

- 細胞含有液を細胞捕捉手段に導入すると、回収必要細胞は該手段内に捕捉され、除去対象細胞は該手段から流出するが、若干容器内にも残存する場合があるので、
- 15 残存した微量の除去対象細胞を洗浄除去する目的で前記手段にリンス液を導入して洗浄することが好ましい。リンス液としては生理的溶液であればいかなるものも使用可能であるが、いくつか例示すると、生理食塩水、ダルベッコリン酸緩衝液(D-PBS)やハanks液(HBSS)などの緩衝液、RPMI 1640などの培地が挙げられる。これらの生理的溶液に、栄養補給、細胞膜保護、抗凝固
- 20 作用付与等の必要に応じ、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、アルブミン、グロブリン、グルコース、サッカロース、トレハロース、グロブリン、CPD(citrate-phosphate-dextrose)、ACD(acid-citrate-dextrose)、EDTA、ヘパリン等を添加しても良い。リンス液の送液方向は細胞含有液を導入した方向と同一方向、その逆方向の2通りがあるが同一方向が好ましい。逆方向ではこの洗浄操作により、
- 25 捕捉されている回収必要細胞が漏出してしまうおそれがある。また、リンス液の粘度は $5\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 未満であることが好ましい。 $5\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以上では捕捉されている回収必要細胞が漏出してしまうおそれがある。

本発明における、前記細胞捕捉手段に $5\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以上 $500\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以下

- の粘度を有する液体を導入する方法としては、細胞捕捉手段にチューブを介して該液体を入れたバッグまたはボトルを接続して、落差、ローラーポンプ、バッグ押しつぶしなどで送液するか、該液体を入れたシリンジを接続し、手押しまたはシリンジポンプなどで送液すればよい。この際、液体の送液方向としては、細胞含有液を導入した方向と同一方向及びその逆方向の2通りがあるが、一般に後者の方が細胞回収率が高いので好ましい。回収液の流速は早い方が回収率が高くなる傾向があるので好ましい。流速を濾過断面積で除した値である線速の範囲は通常、0.5 cm/分以上、好ましくは5 cm/分以上、より好ましくは10 cm/分以上である。
- 5 また、回収液を導入した後、さらに液体を導入して細胞捕捉手段に微量残存した細胞または細胞構成成分を回収しても良い。これにより、たとえば造血幹細胞移植においては必須であるHLAタイピング用検体の採取を本細胞分離操作と同時に行うことができる。細胞捕捉手段に微量残存した細胞または細胞構成成分は、HLAタイピング用以外にも造血幹細胞増幅の研究用、遺伝子診断用、1回目の回収で得られた細胞と併せて移植に用いる等、様々な用途に用いられるが、こ
- 10 15 20 25
- ではHLAタイピングについて若干補足説明をする。

HLAタイピングは有核細胞の核内に存在するDNAを用いて行われる。したがって細胞そのものよりむしろDNAとして回収した方が手間が省けて好ましいので、回収液としては細胞を溶解または破壊させる液体を用いることが好ましい。

- 例としてドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、トリトンX-100などの界面活性剤、蒸留水、イオン交換水などの低張液などが挙げられる。これらにより回収されたDNAは公知のフェノール・クロロホルム法などにより精製しHLAタイピングに供する。

- 本発明では回収した細胞を使用時まで保存しても良い。その保存方法としては、液状保存及び凍結保存の2種類があるが、液状保存は、たとえば造血幹細胞の場合、せいぜい2～3日間が限度であるので、一般に凍結保存が行われている。

次に本発明の細胞分離システムについて説明する。本発明で言う細胞捕捉手段の入口より上流に接続される、細胞含有液を細胞捕捉手段に注入する回路は、細胞含有液が貯留されている容器等に接続し得るもの、または細胞含有液の存在す

る生体組織に接続され得るものである。前者の具体例を挙げると、例えば、細胞含有液を貯留している容器が血液バッグであれば、スパイク付きチューブ、ルアーアダプター（オス、メス）付きチューブ、あるいは無菌接続器による接続（以下「SCD接続」という）を行うのであれば単なるチューブ、というように適宜
5 選択する。また、細胞含有液を貯留している容器が針付きシリンジであれば、穿刺可能なセプタム付きチューブ、針無しでルアー口を有するシリンジであれば、ルアーアダプター（メス）というように上記回路を適宜選択する。後者の具体例を挙げると、例えば臍帯血を対象とした場合、当該生体組織は臍帯および／または胎盤であり、これらを穿刺することが可能な金属針の付いたチューブが挙げら
10 れる。チューブの場合は、途中に回路開閉のためのクランプ、流量調整のためのローラークランプ、凝集塊除去のためのメッシュチャンバー、流速を付与するためのシリンジ（流路切り替え手段を含む）等を有しても良い。また、シリンジの場合、チューブを介さず細胞捕捉手段の入口に直接接続してもよい。

本発明で言う前記細胞捕捉手段の出口より下流に接続される、前記細胞捕捉手段に液体を注入する回路は、細胞捕捉手段に注入する液体を入れた容器を予め接続しておくか、後から接続可能とするかにより、また液体の注入手段により以下の様に分類される。即ち、細胞捕捉手段に注入する液体を入れた容器を予め接続しておく場合は、上記回路としてはバッグ付きチューブ、シリンジ等が挙げられる。バッグの場合、細胞捕捉手段に液体を注入する方法としては、落差による方法、
20 バッグを押しつぶす方法、ローラーポンプを用いる方法等が挙げられる。細胞捕捉手段に注入する液体を入れた容器を後から接続する場合、シリンジを用いる場合はシリンジが接続可能である穿刺可能なセプタム付きチューブ、ルアーアダプター（メス）付きチューブ、三方活栓付きチューブ等が挙げられる。バッグを用いる場合はバッグと接続可能な回路、即ち、スパイク付きチューブ、ルアーアダプター（オス、メス）付きチューブ、あるいはSCD接続を行うのであれば
25 単なるチューブというように上記回路を適宜選択する。また、シリンジの場合、チューブを介さず細胞捕捉手段の出口に直接接続してもよい。

本発明で言う前記細胞捕捉手段の入口より上流に接続される、前記細胞捕捉手段の入口側から細胞を回収する回路は、細胞捕捉手段から流出した細胞をいかな

- る容器で回収するかにより、以下のように分類される。即ち、バッグに回収する場合は、予めバッグを接続しておくか、バッグと接続可能な回路、即ちスパイク付きチューブ、ルアーアダプター（オス、メス）付きチューブ、あるいはS C D接続を行うのであれば単なるチューブというように上記回路を適宜選択する。また、5 5 た、コニカルチューブに収集する場合は、先端が開放された回路であればよく、ルアー口のシリンジで収集する場合はルアーアダプター（メス）、三方活栓等を用いる。また、シリンジの場合、チューブを介さず細胞捕捉手段の入口に直接接続してもよい。

- ここで、該回路、たとえば該細胞捕捉手段から流出した細胞を回収する容器が10 凍結及び解凍に耐えるもの、たとえば凍結バッグ等は、回収後に細胞を凍結バッグに移すという作業が省けるので好ましい。凍結保存バッグの例としては、「クリオサイト」（バクスター社製）、「セルフリーズバッグ」（チャーターメド社製）「ヘモフリーズバッグ」（NPBI社製）等の凍結バッグが挙げられる。

- 本発明による細胞分離システムには、細胞捕捉手段に捕捉された細胞を該細胞15 捕捉手段から回収する前に、該細胞捕捉手段に微量残存する除去対象細胞を洗流するために、細胞捕捉手段に液体を導入する回路をさらに追加してもよい。該回路は液体を入れた容器を予め接続しておくか、後から接続可能とするかにより、また液体の注入手段により以下のように分類される。すなわち、液体を入れた容器を予め接続しておく場合は、該回路としてはバッグ付きチューブ、シリンジが20 用いられる。液体を入れた容器を後から接続する場合、シリンジを用いる時は、該回路としてはシリンジが接続可能である穿刺可能なセプタム付きチューブ、ルアーアダプター（メス）付きチューブが挙げられる。バッグを用いる場合はバッグと接続可能な回路を、即ち、スパイク付きチューブ、ルアーアダプター（オス、メス）付きチューブを、またS C D接続を行う場合は単なるチューブをという様25 に該回路を適宜選択する。また、シリンジの場合、チューブを介さず細胞捕捉手段の出口に直接接続してもよい。該回路の、細胞捕捉手段への接続位置としては、入口側、出口側のいずれでもよいが、入口側が操作の簡便さという点では好ましい。

本発明による細胞分離システムでは回収必要細胞を回収した後に、さらに液体

を細胞捕捉手段に導入し、細胞捕捉手段に残存する細胞または細胞構成成分を採取するための回路を設けてもよい。第一の回収細胞とは使用目的が異なる回収細胞を得る場合、例えばHLAタイピング用として細胞捕捉手段に残存する細胞または細胞構成成分を採取するために細胞を溶解または破壊し得る溶液を用いた場合

5 合には、該回路は最初の回収細胞と混じり合わないよう、流路切り替え手段と複数の分岐からなることが必要である。流路切り替え手段としてはクランプ、スライクなどが挙げられる。

本回路システムを用いた細胞分離方法は、回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を通過させる細胞捕捉手段に、細胞捕捉手段の入口より上流に接続される回路を通じて回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を導入し、細胞捕捉手段の出口から除去対象細胞含有液を導出させた後、細胞捕捉手段の出口より下流に接続される回路から $5\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以上 $500\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以下の粘度を有する液体を細胞捕捉手段に導入し、細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を、細胞捕捉手段の入口より上流に接続される回路により細胞を回収する工程

10 を含むものであるが、回収した細胞を保存する場合には、細胞が回収された、細胞捕捉手段の入口より上流に接続される回路（例えば凍結バッグ）を密封分離する。ここで言う密封分離としては、ヒートシーラー等による熱融着により密封後切断すること、ルアーアダプターで接続していたチューブを本体から外した後、ヒートシーラー等により熱融着すること等が挙げられる。いかなる場合も、「密封分離」とは、例えば密封の後分離するというように何ら操作の順序を規定するものではない。

15

本発明はさらに実質的に赤血球および／または血小板を含まず、造血幹細胞を含む $5\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以上 $500\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以下の液体を提供する。ここで言う「実質的に含まない」とは該細胞含有液を調製する前の細胞含有液から赤血球および

25 /または血小板が60%以上除去されていることを言う。通常、臍帯血には造血幹細胞以外に赤血球を含有しているが、本発明の細胞分離方法を用いることによって、実質的に赤血球を含有しない造血幹細胞溶液の提供が可能となる。また、細胞含有液は凍結保存剤を含むこともできる。

さらに本発明は回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、該回収必

- 要細胞を実質的に捕捉し該除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除去対象細胞含有液を該細胞捕捉手段から導出させ、次に該細胞捕捉手段に5 mPa・s以上500 mPa・s以下の粘度を有する液体を導入して該細胞捕捉手段に捕捉されている該回収必要細胞を該細胞捕捉手段から回収する工程を
- 5 含む細胞分離方法によって得られた、実質的に除去対象細胞を含まない回収必要細胞含有液を提供する。回収必要細胞と除去対象細胞とが混在する溶液に本発明の分離方法を施すことによって、実質的に回収必要細胞からなる溶液の効率的な提供が可能となる。

- さらに本発明は細胞捕捉手段から捕捉された細胞を回収する細胞回収液として
- 10 5 mPa・s以上500 mPa・s以下の粘度を有する液体を提供する。その液体は細胞の保存剤としても使用し得るものが好ましい。保存剤としては、液状保存の場合は、具体的にはグルコースなどの糖類、各種細胞培養用培地などの栄養成分、アルブミン等の細胞膜保護成分等が挙げられ、栄養成分と細胞膜保護成分とを合わせたものとして血漿が挙げられる。凍結保存の場合は、これらにさらに
- 15 凍害保護剤が加えられる。凍害保護剤はその作用機序により1)細胞外凍害保護剤と2)細胞内凍害保護剤とに分類される。上記1)としてはヒドロキシエチルデンプン、デキストラン、ポリビニルピロリドン等の水溶性ポリマーが一般に用いられており、上記2)としてはジメチルスルホキシド、グリセリン等の低分子有機化合物が通常用いられている。
- 20 本発明による回路システムの実施態様を図面により説明するが、本発明はこれらの図面により限定されるものではない。

- 図1は本発明による細胞分離システムの実施態様の一例である。このシステムでは、原料細胞バッグ（回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液が入っている）と本発明システム本体、細胞捕捉手段の出口から流出する液体を回収する
- 25 バッグと本発明システム本体、細胞捕捉手段の入口側から細胞を回収するバッグと本発明システム本体との接続をいずれもスパイクで行い、また、細胞捕捉手段に液体を注入する、オスルアー口を有するシリンジを接続する三方活栓が設けられている。

図1において1は回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通

- 過させる細胞捕捉手段である。2は原料細胞バッグから細胞含有液を細胞捕捉手段に注入する回路であり、スパイク2-1、クランプ2-2、チューブ2-3からなる。3は細胞捕捉手段1の出口から流出する液体を排液する回路であり、スパイク3-1とチューブ3-2からなる。4は細胞捕捉手段1の出口側から該細胞捕捉手段に液体を注入する回路であり、チューブは回路3と共用しており、シリンジを接続する三方活栓4-1を有する。5は細胞捕捉手段の入口側から細胞を回収する回路であり、スパイク5-1、クランプ5-2、チューブ5-3およびチューブ5-3の一部からなる。細胞捕捉手段1の入口からチューブ5-3までのチューブは回路2のチューブ2-3と共用している。
- 10 次にこの細胞捕捉手段の使用方法を説明する。予め、クランプ2-2は閉、三方活栓4-1はシリンジ接続方向のみ閉、クランプ5-2は閉にしておく。次に原料細胞バッグにスパイク2-1を刺し、空のバッグにスパイク3-1を刺す。次いで、クランプ2-2を開けると、細胞含有液は回路2のチューブ2-3を通り、細胞捕捉手段1に供給され、回収必要細胞は捕捉され、除去対象細胞は導出
- 15 され回路3のチューブ3-2を通して空バッグに収集される。細胞含有液を処理し終えた後、クランプ2-2を閉じ、原料細胞バッグからスパイク2-1を抜き、市販の生理食塩水ボトルに刺す。クランプ2-2を開けると、生理食塩水は細胞捕捉手段1をリンスし、回路3を通じ除去対象細胞が収集されているバッグに収集される。リンス終了後、クランプ2-2および3-2を閉じる。次に、三方活
- 20 栓4-1に粘度 $5\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以上 $500\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以下の液体の入ったシリンジを接続し、スパイク5-1を細胞回収バッグに刺す。三方活栓をシリンジと細胞捕捉手段1のみが連通する方向に回し、クランプ5-2を開いた後、シリンジを押し、液体を細胞捕捉手段1の出口側から注入し、細胞捕捉手段に捕捉されている細胞を回路5を通じて細胞回収バッグに回収する。
- 25 以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

実施例1

本実施例は細胞含有液が臍帯血、回収必要細胞が造血幹細胞含有単核球分画、除去対象細胞が赤血球及び血小板である場合の細胞分離例である。

① 細胞分離器

容器外寸（縦×横×厚み） $41 \times 41 \times 18$ mmで、液体流出口と液体流入口とを対角線上にもつポリカーボネート製容器の入口側に平均繊維径 $2.3 \mu\text{m}$ のポリエステル不織布12枚を、出口側に平均繊維径 $12 \mu\text{m}$ のポリエステル不織布25枚を充填した。なお、充填密度は 0.24 g/cm^3 、有効濾過面積 9 cm^2 、有効濾過長 12.4 mm であった。また、このフィルターに血小板通過性を付与する目的で、親水性ポリマーのコーティングを行った。即ち、ヒドロキシエチルメタクリレート・ジメチルアミノエチルメタクリレート共重合体（ヒドロキシエチルメタクリレートとジメチルアミノエチルメタクリレートのモル比＝
10 97 : 3）の1%エタノール溶液を該フィルターの入口側から通液した後、窒素ガスを通して乾燥させた。

② 回収液の調製

市販のデキストラン40生理食塩水溶液（ミドリ十字社製商品名デキストラン40注ーミドリ）をヒト血清アルブミンを4%含むように調製し、これを回収液
15 Aとした。また、この回収液Aを生理食塩水で1.2倍及び1.3倍に希釈したものをそれぞれ回収液B及びCとした。各回収液の粘度は回収液A : $10.5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 、回収液B : $8.0 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 、回収液C : $5.3 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ であった。

③ 細胞分離操作及び回路システム

娩出後の胎盤及び臍帯から採取された15 vol % CPD入りの200 mlの
20 臍帯血を4分割して、同一血で回収液粘度4水準（比較例1を含む）の実験を行った。

図2に示すように血液バッグを、途中で細胞回収用バッグ10が接続されている三方活栓9とメッシュチャンバー8とリンス用生理食塩水ボトルに接続するスパイク13を有するチューブへの分岐を有するチューブとで、上記①で作製した
25 細胞分離器6の入口側に接続した。細胞分離器6の出口側には途中で回収用シリンジ接続用の三方活栓11を有するチューブでドレンバッグ12を接続した。

原料血液バッグ7中の有核細胞含有液を約60 cmの落差で細胞分離器に通液し、細胞分離器6から流出する赤血球、血小板含有液をドレンバッグ12に排液した。次に、生理食塩水ボトルをスパイク13に刺し、クランプ14を開け、

約 20 ml の生理食塩水でフィルター内をリンスし、微量残存する赤血球、血小板を洗浄除去した。次に、三方活栓 11 に回収液 25 ml を入れた 30 ml ディスポーザブルシリンジを接続し、三方活栓 11 をシリンジと細胞分離器のみが連
5 通する方向に回し、また三方活栓 9 を細胞分離器 6 と細胞回収用バッグ 10 のみ
が連通する方向に回した後、シリンジを押して細胞分離器内に捕捉されている細胞を細胞回収用バッグ 10 に回収した。

④ 分析

有核細胞数、単核球数、赤血球数及び血小板数は自動血球計算機にて測定、有
核細胞中の CD 3 4 陽性率は FITC 標識抗 CD 3 4 抗体を用い、SSC-F I
10 TC に展開するフローサイトメトリー法（宮崎、他：日常診療と血液、第 5 巻 2
号、21～24 ページ、1995 年）を用いて測定した。

なお、回収率、除去率の算出方法は以下のとおりである。

回収率 (%) = $100 \times (\text{回収後細胞数} / \text{原料細胞集団中の細胞数})$

除去率 (%) = $100 - 100 \times (\text{回収後細胞数} / \text{原料細胞集団中の細胞数})$

15 ⑤ 結果

シリンジを押しきるまでに要した時間は 3 秒であった。線速を計算すると 55.
6 cm/分となった。結果のまとめを表 1 に示す。回収した細胞液中には有核細胞、単核球、CD 3 4 陽性細胞が高率に回収できており、赤血球、血小板が高率に除去されていることがわかる。

表1

5

回収液種 (mPa・s)	回収率 (%)			除去率 (%)	
	有核細胞	単核球	CD34陽性細胞	赤血球	血小板
A(10.5)	75.2	90.2	97.0	99.0	88.0
B(8.0)	74.0	90.0	96.6	99.0	88.0
C(5.3)	73.0	89.6	95.5	99.0	88.0

10

なお、本回収液で回収された細胞は、極東製薬社製凍結保存剤「CP-1」の取扱説明書に示されているプロトコールでの凍結保存が可能であった。すなわち、本回収液にジメチルスルホキシドを最終濃度として5%になるように添加後、
 15 -80℃のディープフリーザー中で凍結保存して、凍結保存30日後に37℃の温浴で急速融解し、常法のトリパンプルー排除法で細胞のバイアビリティを測定したところ、90.4%と高値を維持していた。

比較例1

本比較例は実施例1と同様に、細胞含有液が臍帯血、回収必要細胞が造血幹細胞含有単核球分画、除去対象細胞が赤血球及び血小板であるが、デキストラン不
 20 含の低粘度の回収液を用いることにより実施例1との比較を行うものである。

① 細胞分離器

実施例1と同様の細胞分離器を用いた。

② 細胞分離操作及び回路システム

原料臍帯血は実施例1で分取したものをを用いた。また、回収液として生理食塩
 25 水25mlを用いるほかは実施例1と同様な操作を行い、また回路システムも同様のものをを用いた。なお、本回収液の粘度は1.0mPa・sであった。

③ 分析

実施例1と同様な分析を行った。

④ 結果

シリンジを押しきるまでに要した時間は3秒であった。

結果のまとめを表2に示す。回収した細胞液中の有核細胞、単核球、CD34陽性細胞の回収率は実施例1よりも低い値であった。

表2

回収液種 (mPa・s)	回収率 (%)			除去率 (%)	
	有核細胞	単核球	CD34陽性細胞	赤血球	血小板
生理食塩水 (1.0)	31.0	40.0	45.0	99.0	89.7

実施例2

本実施例は細胞含有液が末梢血、回収必要細胞が白血球、除去対象細胞が赤血球及び血小板である場合の細胞分離例である。

① 細胞分離器

容器外寸(縦×横×厚み)41×41×18mmで、液体流出口と液体流入口とを対角線上にもつポリカーボネート製容器の入口側に平均繊維径12 μ mのポリエステル不織布25枚を、出口側に平均繊維径2.3 μ mのポリエステル不織布12枚を充填した。なお、充填密度は0.24g/cm³、有効濾過面積9cm²、有効濾過長12.4mmであった。また、このフィルターに血小板通過性を付与する目的で、親水性ポリマーのコーティングを行った。即ち、ヒドロキシエチルメタクリレート・ジメチルアミノエチルメタクリレート共重合体(ヒドロキシエチルメタクリレートとジメチルアミノエチルメタクリレートのモル比=97:3)の1%エタノール溶液を該フィルターの入口側から通液した後、窒素ガスを通して乾燥させた。

② 細胞分離操作

上記①で作製した細胞分離器に健常人末梢全血50ml(CPD15vol%)を液体流入口から落差(約60cm。流速約5ml/分)により通液した後、細

胞分離器内に残存する赤血球、血小板を洗い流す目的で生理食塩水 30 ml を液体流入口から落差 (約 60 cm) で通液した。その後、3.5% ポリビニルピロリドン (平均分子量 36 万) 生理食塩水溶液 30 ml を液体流出口からポンプを用いて 100 ml / 分で導入し、液体流入口から細胞を回収した。なお、本回収

5 液の粘度は 20.3 mPa · s であった。

③ 分析

白血球数、赤血球数及び血小板数を自動血球計算機を用いて測定した。

④ 結果

結果のまとめを表 3 に示す。回収した細胞液中には白血球が高率に回収されており、赤血球、血小板が高率に除去されていた。なお、線速を計算すると 11.1 cm / 分となった。

10

表 3

回収率 (%)	除去率 (%)	
	赤血球	血小板
白血球		
75.0	99.1	90.3

15

20 実施例 3

本実施例は細胞含有液が臍帯血、回収必要細胞が造血幹細胞 (CD 34 陽性細胞)、除去対象細胞が赤血球及び血小板である場合の細胞分離例である。

① 細胞分離器

容器外寸 (縦×横×厚み) 41×41×18 mm で、液体流出口と液体流入口とを対角線上にもつポリカーボネート製容器の入口側に平均繊維径 12 μm のポリエステル不織布 12 枚を、出口側に平均繊維径 2.3 μm のマウス抗ヒト CD 34 モノクローナル抗体 (コールター社製、クローン名 Imm u 133、以下 CD 34 抗体と略す) 固定ポリスチレン不織布 25 枚を充填した。本フィルターの充填密度は 0.2 g / cm³ であった。なお、マウス抗ヒト CD 34 モノクロー

25

ナル抗体のポリスチレンへの固定は特開平2-261833号公報で提案されている公知のハロアセトアミド法にて行った。即ち、ポリスチレン不織布を活性化
5 する目的で、スルホラン165mlにヒドロキシメチルヨードアセトアミド3.6gとトリフルオロメタンスルホン酸25gを添加した反応液に前述のポリスチレン不織布（予め前述の寸法に切断してある）を室温で5時間浸漬、反応させた。
D-PBSで活性化済み不織布を洗浄した後、この活性化済み不織布に抗体を固定する目的でD-PBSで20 μ g/mlに調製したCD34抗体溶液10mlに活性化済み不織布を2時間含浸し、D-PBSで洗浄後、真空乾燥して抗体固定不織布とした。

10 ② 回収液の調製

市販のデキストラン40生理食塩水溶液（ミドリ十字社製商品名デキストラン40注-ミドリ）をヒト血清アルブミンを4%含むように調製し、これを回収液とした。なお、本回収液の粘度は9.8mPa \cdot sであった。

③ 細胞分離操作

15 ヒト新鮮臍帯血（抗凝固剤CPD15vol%入り）50mlを入れた血液バッグを、途中に生理食塩水バッグと細胞回収バッグへの分岐を有するチューブで、上記①で作製した細胞分離器の入口側に接続した。細胞分離器の出口側には途中に三方活栓を有する

チューブでドレーン用血液バッグを接続した。新鮮臍帯血50mlを落差（約6
20 0cm）で通液し、フィルターから流出する赤血球含有液（CD34陰性細胞、血小板も含む）をドレーンバッグに回収した。その後、フィルター内に残存する赤血球、血小板、CD34陰性細胞を洗い流す目的で生理食塩水30mlを通液した。その後、上記②で調製した回収液30mlを入れたシリンジを、細胞分離器の出口側チューブの三方活栓に接続し、シリンジを押して回収液を細胞分離器
25 内に注入、捕捉されている細胞を入口側に接続されている細胞回収バッグに回収した。

③ 分析

実施例1と同様な分析を行った。

④ 結果

シリンジを押しきるまでに要した時間は3秒であった。線速を計算すると55.6 cm/分となった。結果のまとめを表4に示す。回収した細胞液中にCD34陽性細胞が高率に回収できており、赤血球、血小板、CD34陰性細胞が高率に除去されていることがわかる。

表4

回収率 (%)	除去率 (%)		
	赤血球	血小板	CD34陰性細胞
78	99.2	90.4	90

実施例4

本実施例は細胞含有液が臍帯血、回収必要細胞が造血幹細胞含有単核球分画、除去対象細胞が赤血球及び血小板で、HLAタイピング用DNAを同時に採取する場合の細胞分離例である。

① 細胞分離器

実施例1と同様の細胞分離器を用いた。

② 回収液の調製

市販のデキストラン40生理食塩水溶液（ミドリ十字社製商品名デキストラン40注ーミドリ）をヒト血清アルブミンを4%含むように調製し、これを初回収液（細胞を回収するためのもの）、低張液である注射用蒸留水を追加回収液（細胞構成成分を回収するためのもの）とした。なお初回収液の粘度は10.5 mPa・sであった。

③ 回路システム

上記①の細胞分離器を回路に組み込み図3の細胞分離システムとした。このシステムは、細胞含有液バッグと本発明システム本体、細胞捕捉手段の出口から流出する液体を回収するバッグと本発明システム本体との接続をいずれもスパイクで行い、細胞捕捉手段の入口側から細胞を回収する回路には移植用細胞回収用凍

結バッグと、HLAタイピング用にコニカルチューブに回収するための先端がスパイクになっているチューブを設け、クランプで流路を切り替えるものである。

④ 細胞分離操作

図3の回路システムを用いて細胞分離操作を行った。

- 5 予めクランプ21は閉、三方活栓25はシリンジ接続方向のみ閉、クランプ27、28は閉にしておく。

- ヒト新鮮臍帯血（抗凝固剤CPD15vol%入り）50mlを入れた血液バッグにスパイク20を刺し、空のバッグにスパイク23を刺す。次いで、クランプ21を開けると、細胞含有液は回路16のチューブ22を通り、細胞捕捉手段10に供給され、造血幹細胞含有単核球分画は捕捉され、赤血球、血小板は回路17のチューブ24を通して空バッグに排液される。前記細胞含有液を処理し終えた後、クランプ21を閉じ、細胞含有液の入っていたバッグからスパイク20を抜き、市販の100ml生理食塩水ボトルに刺す。クランプ21を開けると、生理食塩水は細胞捕捉手段15内に微量残存する赤血球、血小板を洗い流し、回路157を通じて排液される。その後、クランプ21を閉じる。次に三方活栓25に上記②で調製した回収液25mlを入れた30mlシリンジを接続し、三方活栓25をシリンジと細胞捕捉手段15のみが回路18を介して連通する方向に回し、クランプ27を開く。シリンジを押して回路19を介して凍結バッグ29に細胞を回収した。次に三方活栓25からシリンジをはずし、注射用蒸留水25mlの20 入った別のシリンジを接続する。クランプ27を閉じ、回路19のチューブ32とY字管26とを介して連通し得るチューブ31に設けられたクランプ28を開け、スパイク30の下にコニカルチューブを置き、シリンジを押して注射用蒸留水を細胞捕捉手段に導入し、捕捉されている細胞を破壊し、その中の粗DNAをコニカルチューブに回収した。回収した粗DNAを常法であるプロテナーゼKによる除タンパクとフェノール・クロロホルム法により精製した。
- 25 による除タンパクとフェノール・クロロホルム法により精製した。

⑤ 分析

細胞数は実施例1と同様の方法で分析した。また、精製後のDNA量は分光光度計により260nmの吸光度を測定する常法（中山、他：細胞工学別冊「バイオ実験イラストレイテッド」①分子生物学実験の基礎、1995年）で測定した。

⑥ 結果

シリンジを押しきるまでに要した時間は3秒であった。線速を計算すると55.6 cm/分となった。結果のまとめを表5に示す。回収した細胞液中には有核細胞、単核球、CD34陽性細胞が高率に回収できており、赤血球、血小板が高率に除去されていることがわかる。また、得られたDNAもHLAタイピングに充分な量である約10 μ gが得られていることが分かる。

表5

10	回収率 (%)			除去率 (%)		精製後 DNA量 (μ g)
	有核細胞	単核球	CD34陽性細胞	赤血球	血小板	
	75.0	90.4	97.2	98.9	88.3	9.8

15 実施例5

本実施例は細胞含有液が骨髓、回収必要細胞が造血幹細胞含有単核球分画、除去対象細胞が赤血球及び血小板である場合の細胞分離例である。

① 細胞分離器

実施例1と同様の細胞分離器を用いた。

20 ② 回収液の調製

市販のデキストラン40生理食塩水溶液（ミドリ十字社製商品名デキストラン40注—ミドリ）をヒト血清アルブミンを4%含むように調製し、これを回収液とした。また、この回収液の粘度は10.1 mPa·sであった。

③ 細胞分離操作及び回路システム

25 骨髓30 ml（抗凝固剤ヘパリン15単位/ml）が入った血液バッグを、図2に示すように途中に細胞回収用バッグ10が接続した三方活栓9とメッシュチャンバー8とリンス用生理食塩水ボトルに接続するスパイク13を有するチューブへの分岐を有するチューブで、①で作製した細胞分離器6の入口側に接続した。細胞分離器6の出口側は途中に回収用シリンジ接続用の三方活栓11を有するチ

ューブでドレンバッグ12を接続した。原料血液バッグ7中の有核細胞含有液を約60cmの落差で細胞分離器に通液し、細胞分離器6から流出する赤血球含有液をドレンバッグ12に排液した。次に、生理食塩水ボトルをスパイク13に刺し、クランプ14を開け、約20mlの生理食塩水でフィルター内をリンスし、微量残存する赤血球、血小板を洗浄除去した。次に、三方活栓11に回収液25mlを入れた30mlディスポーザブルシリンジを接続し、三方活栓11をシリンジと細胞分離器のみが連通する方向に回し、また三方活栓9を細胞分離器6と細胞回収用バッグ10のみが連通する方向に回した後、シリンジを押して細胞分離器内に捕捉されている細胞を細胞回収用バッグ10に回収した。

10 ④ 分析

有核細胞数、単核球数、赤血球数及び血小板数は自動血球計算機にて測定、有核細胞中のCD34陽性率はFITC標識抗CD34抗体を用い、SSC-FITCに展開するフローサイトメトリー法（宮崎、他：日常診療と血液、第5巻2号、21～24ページ、1995年）を用いて測定した。

15 なお、回収率、除去率の算出方法は以下のとおりである。

$$\text{回収率 (\%)} = 100 \times (\text{回収後細胞数} / \text{原料細胞集団中の細胞数})$$

$$\text{除去率 (\%)} = 100 - 100 \times (\text{回収後細胞数} / \text{原料細胞集団中の細胞数})$$

⑤ 結果

シリンジを押しきるまでに要した時間は3秒であった。線速を計算すると55.6cm/分となった。結果のまとめを表6に示す。回収した細胞液中には有核細胞、単核球、CD34陽性細胞が高率に回収できており、赤血球、血小板が高率に除去されていることがわかる。

表6

除去率 (%)			回収率 (%)	
有核細胞	単核球	CD34陽性細胞	赤血球	血小板
74.3	91.2	97.6	99.0	88.0

産業上の利用の可能性

- 以上示したように、本発明によれば簡便かつ短時間の操作で、造血幹細胞等の有用細胞が高率に回収でき、また得られた細胞含有液はその後の煩雑な細胞浮遊液調製操作を経ることなく凍結保存が可能なので、造血幹細胞移植分野や養子免疫療法分野等の医療関連産業における細胞処理工程の省力化に利用することができる。
- 5

請求の範囲

1. 回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、該回収必要細胞を実質的に捕捉し該除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除去
- 5 対象細胞含有液を該細胞捕捉手段から導出させ、次に該細胞捕捉手段に $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する液体を導入して該細胞捕捉手段に捕捉されている該回収必要細胞を該細胞捕捉手段から回収する工程を含む細胞分離方法。
2. 回収必要細胞が有核細胞である請求項 1 に記載の細胞分離方法。
- 10 3. 有核細胞が造血幹細胞含有単核球分画である請求項 2 に記載の細胞分離方法。
4. 有核細胞が造血幹細胞である請求項 2 に記載の細胞分離方法。
5. 除去対象細胞が核を持たない細胞である請求項 1 に記載の細胞分離方法。
6. 核を持たない細胞が赤血球および／または血小板である請求項 5 に記載の
- 15 細胞分離方法。
7. 除去対象細胞が回収必要細胞とは異なる表面マーカーを有する細胞である請求項 1 に記載の細胞分離方法。
8. 回収必要細胞と除去対象細胞を含む細胞含有液が臍帯血である請求項 1 に記載の細胞分離方法。
- 20 9. 回収必要細胞と除去対象細胞を含む細胞含有液が骨髓である請求項 1 に記載の細胞分離方法。
10. 回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液が末梢血である請求項 1 に記載の細胞分離方法。
11. 細胞捕捉手段が多孔質構造体を液体流入口と液体流出口とを有する容器
- 25 に充填したものである請求項 1 に記載の細胞分離方法。
12. 多孔質構造体の不織布またはスポンジ状構造体である請求項 11 に記載の細胞分離方法。
13. 細胞捕捉手段が回収必要細胞には発現しているが、除去対象細胞には発現していない抗原に対する抗体を固定した細胞分離器である請求項 1 に記載の細

胞分離方法。

- 1 4. 回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、該回収必要細胞を
実質的に捕捉し該除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除
去対象細胞含有液を該細胞捕捉手段から導出させ、次に該細胞捕捉手段に 5 m
5 Pa・s 以上 5 0 0 mPa・s 以下の粘度を有する液体を導入して該細胞捕捉手
段に捕捉されている該回収必要細胞を該細胞捕捉手段から回収し、その後回収し
た細胞を保存する工程を含む細胞分離保存方法。

1 5. 保存が凍結保存である請求項 1 4 に記載の細胞分離保存方法。

- 1 6. 回収必要細胞と除去対象細胞を含む細胞含有液を、該回収必要細胞を
10 質的に捕捉し、該除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除
去対象細胞含有液を該細胞捕捉手段から導出させ、次に該細胞捕捉手段に 5 mPa
a・s 以上 5 0 0 mPa・s 以下の粘度を有する液体を導入して該細胞捕捉手段
に捕捉されている該回収必要細胞を該細胞捕捉手段から回収し、次いで回収した
細胞を凍結保存し、その後凍結保存した細胞を解凍する工程を含む細胞分離保存
15 方法。

1 7. 5 mPa・s 以上 5 0 0 mPa・s 以下の粘度を有する液体が、回収必
要細胞の保存剤として使用し得るものである請求項 1、1 4 または 1 6 のいずれ
か一項に記載の方法。

- 1 8. 5 mPa・s 以上 5 0 0 mPa・s 以下の粘度を有する液体がデキスト
20 ランを含む溶液である請求項 1、1 4 または 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

1 9. 5 mPa・s 以上 5 0 0 mPa・s 以下の粘度を有する液体を導入する
前に、細胞捕捉手段に 5 mPa・s 未満の粘度を有する液体を導入する工程をさ
らに含む請求項 1、1 4 または 1 6 のいずれか一項に記載の方法

- 2 0. 5 mPa・s 以上 5 0 0 mPa・s 以下の粘度を有する液体を導入して
25 回収必要細胞を回収した後に、さらに液体を細胞捕捉手段に導入し、該細胞捕捉
手段に残存する細胞または細胞構成成分を採取する請求項 1 に記載の細胞分離方
法。

2 1. 5 mPa・s 以上 5 0 0 mPa・s 以下の粘度を有する液体を導入した
後に導入する液体が、捕捉した細胞を溶解または破壊し得る溶液である請求項 2

0 に記載の細胞分離方法。

2 2. 細胞を溶解または破壊し得る溶液が、界面活性剤または低張液である請求項 2 1 に記載の細胞分離方法。

2 3. 5 mPa・s 以上 500 mPa・s 以下の粘度を有する液体を導入する
5 方向が、回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を導入する方向とは逆
の方向から導入する請求項 1、1 4 または 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

2 4. 回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる、
少なくとも入口と出口とを有する細胞捕捉手段と、該細胞捕捉手段の入口より上
流に接続される、回収必要細胞と除去対象細胞を含む細胞含有液を細胞捕捉手段
10 に注入する回路と、該細胞捕捉手段の出口より下流に接続される該細胞捕捉手段
に液体を注入する回路と、該細胞捕捉手段の入口より上流に接続される該細胞捕
捉手段の入口側から細胞を回収する回路とからなる細胞分離システム。

2 5. 細胞捕捉手段の入口より上流に接続される該細胞捕捉手段の入口側から
細胞を回収する回路が、凍結融解に耐える材質からなる請求項 2 4 に記載の細胞
15 分離システム。

2 6. 細胞を回収する回路が凍結バッグを含むものである請求項 2 5 に記載の
細胞分離システム。

2 7. さらに細胞捕捉手段の入口より上流または出口より下流に接続される、
該細胞捕捉手段に液体を導入する回路を有する請求項 2 4 に記載の細胞分離シス
20 テム。

2 8. 細胞捕捉手段の入口より上流に接続される該細胞捕捉手段の入口側から
細胞を回収する回路が流路切り替え手段と複数の分岐とを有するものである請求
項 2 4 に記載の細胞分離システム。

2 9. 回収必要細胞を実質的に捕捉し、除去対象細胞を実質的に通過させる細
25 胞捕捉手段に該細胞捕捉手段の入口より上流に接続される回路を通じて回収必要
細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を導入し、該細胞捕捉手段の出口から除
去対象細胞含有液を導出させ、次いで該細胞捕捉手段の出口より下流に接続され
る回路から 5 mPa・s 以上 500 mPa・s 以下の粘度を有する液体を該細胞
捕捉手段に導入し、該細胞捕捉手段に捕捉されている回収必要細胞を、該細胞捕

捉手段の入口より上流に接続される回路から回収する工程を含む細胞分離方法。

30. 細胞捕捉手段の入口より上流に接続される回路から細胞を回収し、次いでさらに該回路を密封分離する工程を含む請求項29に記載の細胞分離方法。

31. 実質的に赤血球および／または血小板を含まない5 mPa・s以上500 mPa・s以下の粘度を有する造血幹細胞含有液。

32. 凍結保存剤を含む請求項31に記載の細胞含有液。

33. 凍結保存剤が細胞外凍害保護剤および／または細胞内凍害保護剤である請求項32に記載の細胞含有液。

34. デキストランを含む請求項31に記載の細胞含有液。

10 35. 回収必要細胞と除去対象細胞とを含む細胞含有液を、該回収必要細胞を実質的に捕捉し該除去対象細胞を実質的に通過させる細胞捕捉手段に導入し、除去対象細胞含有液を該細胞捕捉手段から導出させ、次に該細胞捕捉手段に5 mPa・s以上500 mPa・s以下の粘度を有する液体を導入して該細胞捕捉手段に捕捉されている該回収必要細胞を該細胞捕捉手段から回収する工程を含む細胞
15 分離方法によって得られた、実質的に除去対象細胞を含まない回収必要細胞含有液。

36. 5 mPa・s以上500 mPa・s以下の粘度を有する液体である、細胞捕捉手段から捕捉された細胞を回収するための回収用液体。

37. 細胞の保存剤としても使用し得る請求項36に記載の回収用液体。

20 38. 細胞の保存が凍結保存である請求項37に記載の回収用液体。

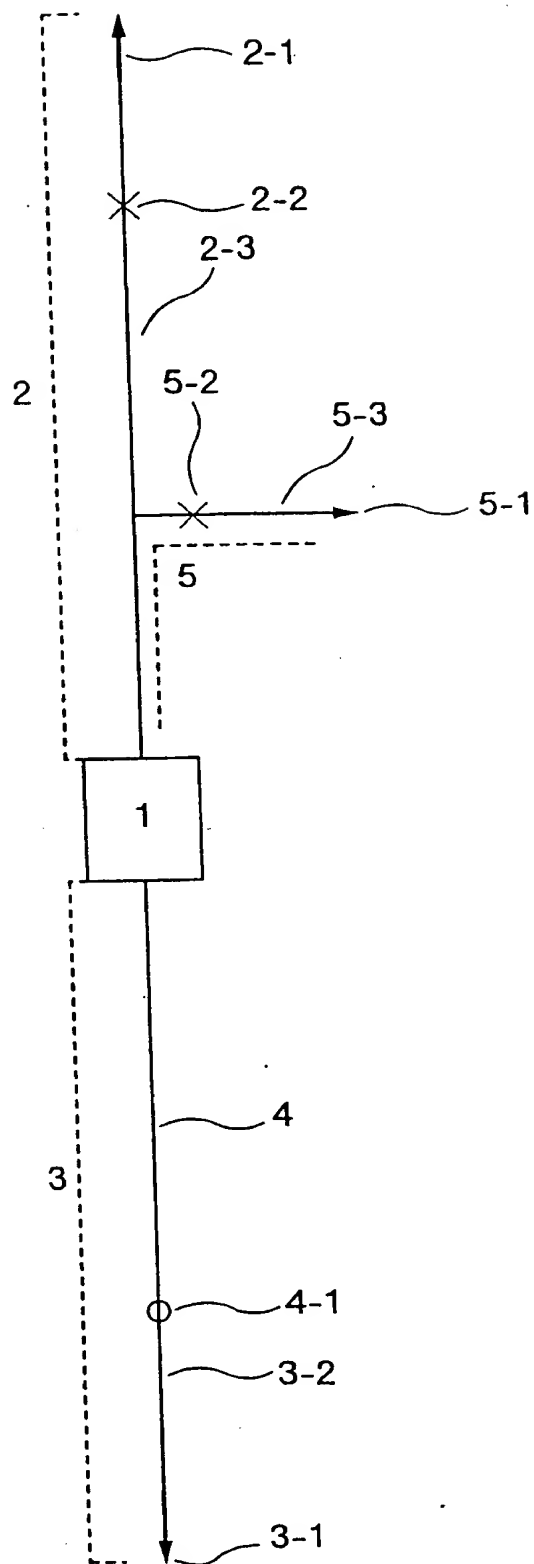
39. デキストランを含む溶液である請求項36～38のいずれか一項に記載の回収用液体。

40. 細胞が造血幹細胞含有単核球分画である請求項36に記載の回収用液体。

41. 細胞が造血幹細胞である請求項36に記載の回収用液体。

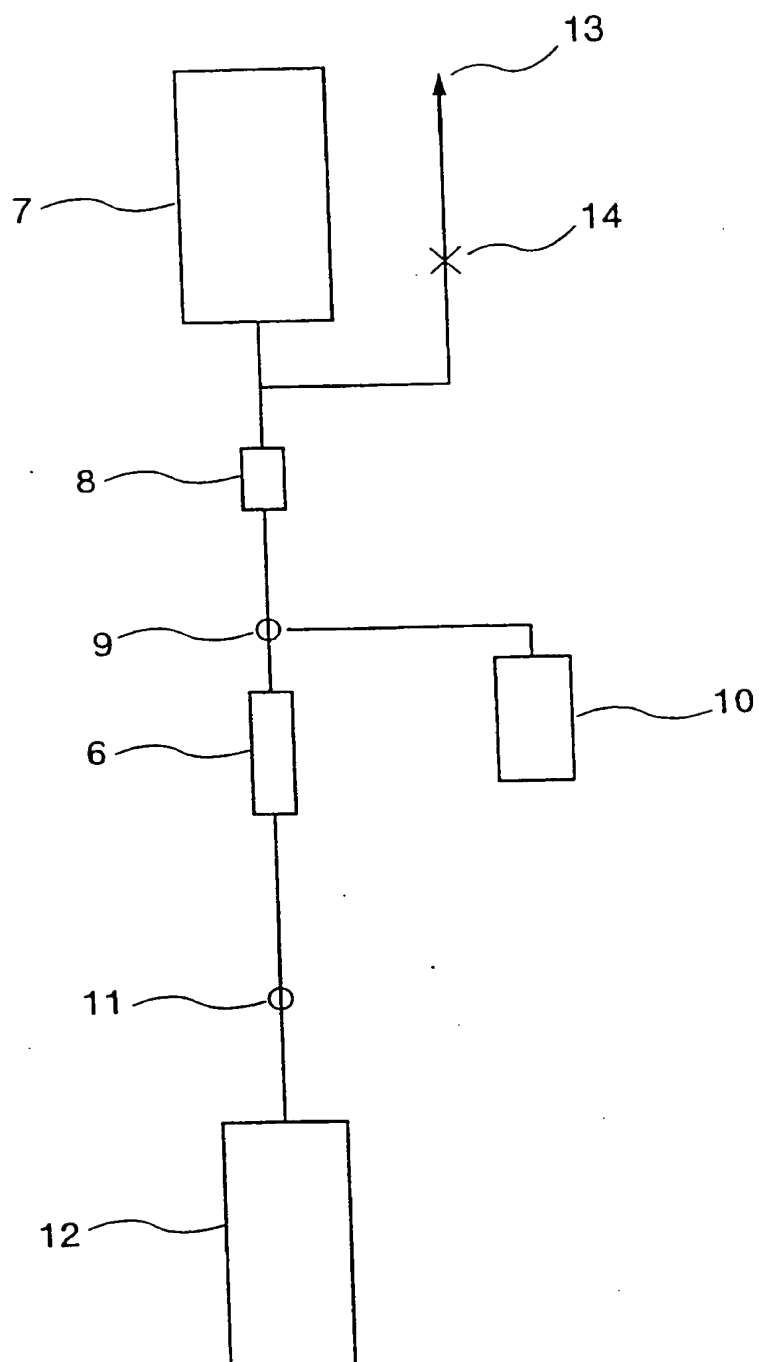
1 / 3

FIG. 1



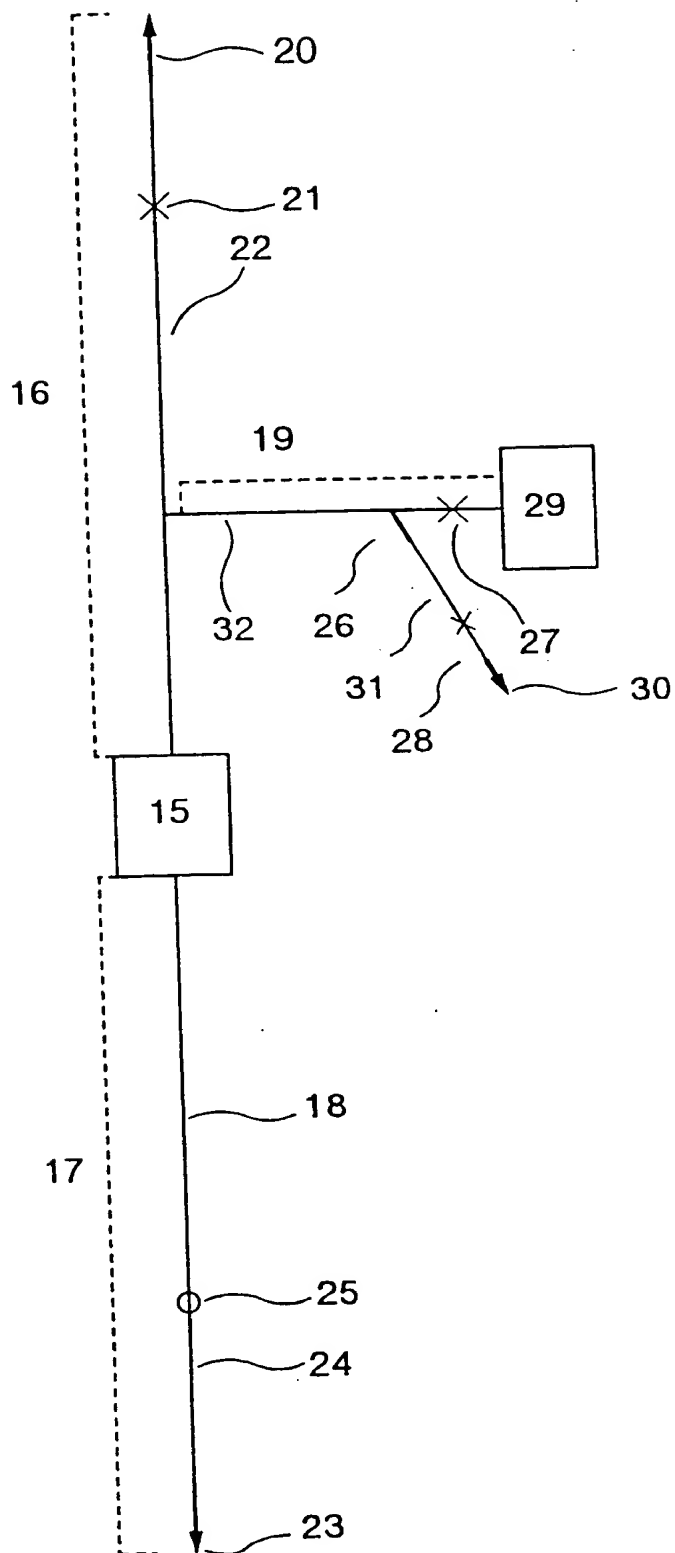
2/3

FIG. 2



3 / 3

FIG. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.C1⁶ C12N5/08, C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.C1⁶ C12N5/08, C12M3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST File. (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 8-104643, A (Asahi Medical Co., Ltd.), April 23, 1996 (23. 04. 96) (Family: none)	1-41
Y	JP, 2-200176, A (Hitachi, Ltd.), August 8, 1990 (08. 08. 90) (Family: none)	1-41
A	GAO, S.J. "'Xue Fu Zhu Yu Tang' Extract May Reduce the Red Cell Aggreability", "Progress of Studies on Circulatory Diseases (in Japanese)" (1995) Vol. 16, No. 1 p.124-127	1-41
A	JP, 64-5486, A (Hitachi, Ltd.), January 10, 1989 (10. 01. 89) (Family: none)	1-41
A	JP, 2-227070, A (Asahi Optical Co., Ltd.), September 10, 1990 (10. 09. 90) & DE, 4006293, A & SE, 9000650, A & JP, 3007581, A & JP, 3021342, & US, 5085781, A & DE, 4042579, A1 & US, 35267, E & JP, 2543766, B2	1-41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later than
the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority
date and not in conflict with the application but cited to understand
the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such combination
being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
April 20, 1998 (20. 04. 98)

Date of mailing of the international search report
April 28, 1998 (28. 04. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/00244

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 61-235752, A (Asahi Optical Co., Ltd.), October 21, 1986 (21. 10. 86) & GB, 2175602, A & US, 4761366, A & CH, 668960, A & GB, 2175602, B & US, 5098842, A & JP, 93013269, B	1-41
A	JP, 8-92001, A (Asahi Medical Co., Ltd.), April 9, 1996 (09. 04. 96) (Family: none)	1-41

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 5/08, C12M 3/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 5/08, C12M 3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 8-104643, A (旭メディカル株式会社) 23. 4月. 1996 (23. 04. 96) パテントファミリー無し	1-41
Y	JP, 2-200176, A (株式会社日立製作所) 8. 8月. 1990 (08. 08. 90) パテントファミリー無し	1-41
A	GAO, S. J. "Xue Fu Zhu Yu Tang' Extract May Reduce the Red Cell Aggreability", 循環器病研究の進歩 (1995) 第16巻, 第1号 p. 124-127	1-41

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 20. 04. 98

国際調査報告の発送日 28. 04. 98

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
小暮 道明
電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 64-5486, A (株式会社日立製作所) 10. 1月. 1989 (10. 01. 89) パテントファミリー無し	1-41
A	JP, 2-227070, A (旭光学工業株式会社) 10. 9月. 1990 (10. 09. 90) &DE, 4006293, A &SE, 9000650, A &JP, 3007581, A &JP, 3021342, &US, 5085781, A &DE, 4042579, A1 &US, 35267, E &JP, 2543766, B2	1-41
A	JP, 61-235752, A (旭光学工業株式会社) 21. 10月. 1986 (21. 10. 86) &GB, 2175602, A &US, 4761366, A &CH, 668960, A &GB, 2175602, B &US, 5098842, A &JP, 93013269, B	1-41
A	JP, 8-92001, A (旭メディカル株式会社) 9. 4月. 1996 (09. 04. 96) パテントファミリー無し	1-41